动 物 学 研 究 2004, Aug. 25 (4): 351-355
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

线粒体DNA序列分析在鳞石蛾科（昆虫纲：毛翅目）成、幼虫联系中的应用

单林娜，杨莲芳*，王备新
（南京农业大学 昆虫系，江苏 南京 210095）

摘要：水生昆虫幼虫的种类鉴定是影响水质生物监测准确性的重要因素，我国这方面的形态学鉴定资料极其缺乏。本研究测定和分析了4种鳞石蛾成虫及其疑似幼虫的mtDNA-COⅠ、Ⅱ及tRNA基因序列，发现鳞石蛾成虫与其疑似幼虫的序列歧异度均<1%，属于种内差异，由此确认了4种供试幼虫与其对应成虫的联系。研究表明利用线粒体DNA细胞色素氧化酶基因序列分析鉴定鳞石蛾类幼虫是可行的，为加快水生昆虫的幼虫分类研究提供了新途径。

关键词：鳞石蛾；水生昆虫；幼虫；线粒体DNA；COⅠ；COⅡ
中图分类号：Q969.41 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2004)04-0351-05

Association of Larval and Adult Stages of Ecologically Important Caddisfly (Insecta: Trichoptera) Using Mitochondrial DNA Sequences

SHAN Lin-na, YANG Lian-fang*, WANG Bei-xin
(*Entomology Department, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*)

Abstract: Identification of the larva stage of aquatic insects is one of the most important factors in biomonitoring water quality. So far, the morphological diagnostic character for many mature and early instar larvae are still lacking in China. The partial sequences of the mitochondrial COⅠ, COⅡ and tRNA gene of the adults and larvae of 4 species from Lepidostomatidae were sequenced and compared in this study. The results indicate that intraspecific divergence is <1% between the adult and larva and the interspecific divergence is 14% - 24%. The study proves that the mitochondrial DNA sequence analysis is a useful tool to associate the larval and adult stages of Trichoptera, in turn; it will be valuable for health assessment of stream ecosystems.

Key words: Lepidostomatidae; Aquatic insect; Larva; Mitochondrial DNA; COⅠ; COⅡ

毛翅目鳞石蛾科（Trichoptera: Lepidostomatidae）幼虫广泛分布在我国的清洁河流与溪水中（耐污值为1~3）（Morse et al, 1994），可作为极清洁-清洁水体的重要指示种类应用于水质生物评价。但由于幼虫种类鉴定资料极其缺乏，许多种类的幼虫形态迄今尚未描述，影响了水质生物监测的准确性。因此，从速解决幼虫的鉴定问题对研究水生昆虫分类学和生态学有重要意义。

幼虫种类鉴定的传统方法是将野外采集到的幼虫带回实验室内饲养至成虫。由于毛翅目幼虫生活于流水中，绝大部分对水质要求很高，生活周期长（多为1年1代），且食性复杂，难以饲养，因此使用传统方法进行种类鉴定有很大困难。20世纪80年代等位酶电泳技术始用于幼虫分类研究（Bertocher, 1980; Drew & Hardy, 1981），但因特异性不够强而使应用受限。

收稿日期：2004-02-20；接受日期：2004-03-29
基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金资助项目（B200102）
* 通讯作者（Corresponding author），Tel：025-84395241，E-mail：lfyang@njau.edu.cn

近十几年来，随着分子生物学的发展，尤其是测序技术的突破，核酸序列分析（DNA sequence analysis）越来越多地用于分类学研究。线粒体DNA（mitochondrial DNA）遵循母系遗传，其一级结构在种间和种内都存在显著的歧异，具有进化的自主性和简捷性，是分子分类学重要的标记之一。其细胞色素氧化酶Ⅰ、Ⅱ（COⅠ、COⅡ）在近缘种及种下阶元的分类鉴定中应用较广，在法医昆虫学上可用于蝇类幼虫鉴定（Sperling et al, 1994; Malgorn & Coquoz, 1999）。但迄今尚未见到用于毛翅目成幼虫联系研究的报道。本工作选择了4种鳞石蛾的成、幼虫，尝试从基因序列进行同种成幼虫联系的研究。

1 材料和方法

1.1 标 本

本研究所用标本均采自安徽省祁门县彭龙乡沥水河（表1）。成虫为15瓦黑光灯诱捕，99.5%乙醇保存；幼虫为D形网采集，活虫水养3~5 d，待消化道排空后，99.5%乙醇保存备用。

1.2 总DNA提取

参考Roehrdanz（1997）的方法，并加以改进。①将单头雄成虫（腹末外生殖器存档）或单头幼虫（头和前胸存档）放入一只1.5 mL离心管中，加入足量液氮充分研磨；②吸取500 μL 65 ℃预热的2×CATB缓冲液［0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8），1.4 mol/L NaCl，0.02 mol/L EDTA，2% CTAB，0.2% α－巯基乙醇］，注入管中少许，继续研磨后，将余液全部注入；③匀浆物置于65 ℃孵育45~60 min，中途混匀数次；④短暂离心，将上清液转至一只新管，沉淀用200 μL 2×CATB再悬浮，孵育20~30 min后离心；⑤将两次的上清液合并，用等体积的苯酚:氯仿（1:1）抽提，12 000 r/min离心10 min；⑥水相用等体积的氯仿再抽提一次，12 000 r/min离心10 min；⑦水相与2/3体积异丙醇混合，4 ℃放置1 h过夜；⑧10 000 r/min离心15 min使DNA成团；⑨用70%乙醇漂洗，干燥，加50 μL 0.1×TE（10 mmol/L Tris和1 mmol/L EDTA）再悬浮。

1.3 mtDNA的COⅠ、COⅡ及tRNA基因扩增

采用的引物有：①通用引物TY-J-1460（5′-TAC-AATTATCGCCTAAACTTCA-GCC-3′）和C2-N-3661（5′-CCACAAATTTCAGAACATTGTCCA-3′）（Simon et al, 1994），用于表1中除傅氏鳞石蛾成虫以外的所有标本的COⅠ、COⅡ及tRNA的基因扩增；②设计引物P11（5′-TAGCTCACGCTGGAAG-3′）和P12（3′GTTAGGGAAGG-GAAACAC-5′），系根据傅氏鳞石蛾幼虫的COⅠ+Ⅱ序列，利用Primer 5.0和Oligo 6软件包设计而得，用于傅氏鳞石蛾雄成虫的基因扩增。以上2对引物均由大连宝生物公司合成。PCR反应体系为：10×ExTaq缓冲液2.5 μL，2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μL，25 mmol/L magnesium

表1 本研究测序标本

Table 1 Specimens newly sequenced for this study

物种 Species	标本编号 Voucher specimen no.	虫态 Dev. stage	采集时间及海拔 Col. time and elevation
黄褐鳞石蛾 *Lepidostoma flavum*	L. N. SHAN, LMA0102 (NAUIC)	A	2002.05.30 530 m
	L. N. SHAN, LML0103 (NAUIC)	L	2002.11.02 490 m
傅氏鳞石蛾 *L. fui*	C. H. UN, LMA0201 (NAUIC)	A	2002.05.30 530 m
	C. H. SUN, LML0203 (NAUIC)	L	2003.08.24 380 m
弓突鳞石蛾 *L. arcuatum*	B. X. WANG, LML0302 (NAUIC)	A	2003.09.29 490 m
	B. X. WANG, ML0302 (NAUIC)	L	2002.05.30 530 m
莫氏斑胸鳞石蛾 *Paraphlegopteryx morsei*	L. N. SHAN, LMA0403 (NAUIC)	A	2003.06.06 410 m
	L. N. SHAN, LML0406 (NAUIC)	L	2003.08.26 490 m

A：雄成虫（Adult male）；L：幼虫（Larvae）。

1.5 μL，20 μmol/L 引物各 0.3 μL，ExTaq DNA 聚合酶 1 U，5 ~ 10 ng/μL 总 DNA 模板 1.0 μL，纯水 17.7 μL，总体积 25 μL。PCR 条件是：95 ℃ 5 min 预变性；94 ℃ 40 s，52 ℃ 50 s，72 ℃ 2 min，共 40 个循环；72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物检查：取 PCR 反应产物 5 μL，在 1%琼脂糖凝胶上，5 V/cm 电压电泳 50 min。紫外灯下观察结果。

1.4 序列测定与分析

采用克隆测序方法测定成幼虫克隆片段的序列。PCR 产物纯化后，与 pMD18-T（大连宝生物公司）载体连接，转化感受态宿主菌 DH5α，通过蓝白斑筛选和限制性酶切鉴定重组质粒。将含有重组质粒的菌株交大连宝生物公司测序。测序仪为 ABI PRISM™377XL DNA Sequencer。共测定了 12 个克隆子，其中傅氏鳞石蛾成、幼虫各 2 个，弓突鳞石蛾成、幼虫各 1 头，黄纹鳞石蛾和莫氏斑胸鳞石蛾成虫 2 头、幼虫 1 头。

利用“BLAST”工具（NCBI 站点）进行序列分析、DNA 序列检索及同源性比较。采用 Dnastar Package 中的 Editseq 软件进行序列编辑、ORF 查找；采用 Clustal X 软件进行序列比对（alignment）；比对结果输入 MEGA2.1 软件计算各样品间的遗传距离，并基于 Kimura 2-parameter 模型，用邻接法（neighbor-joining，NJ）构建系统发生树，通过自展（bootstrap 1 000 次）检验获得系统树分支的置信度。

2 结果和分析

扩增并测定了 4 种鳞石蛾的成、幼虫的 mtDNA COⅠ、COⅡ及 tRNA-Leu 基因序列（表 2）。所测序列与果蝇 *Drosophila yakuba* 线粒体基因组序列（GenBank 检索号 NC－001322）（Clary & Wolstenholme，1985）的对应位点是 1435—3684。在所测基因序列的碱基组成中，A% + T%平均为 70.4%，编码 COⅠ和 COⅡ的密码子第三位点的 A% + T%则分别是 82.9%和 85.0%，与其他昆虫一样，显示出较强的 AT 偏倚，尤其是第三位点。

对鳞石蛾 8 个 COⅠ和 COⅡ序列的比对分析表明：在 COⅠ区的 1 451 个比对位点中，有 1 260 个保守位点，191 个变异位点，其中 98 个转换位点，93 个颠换位点；发生在密码子第三、第一和第二位点的变异分别为 78%、18%和 4%；种内序列歧异度为 0 ~ 0.9%，而种间为 14% ~ 24%（表 3）。在 COⅡ区的 591 个比对位点中，有 516 个保守位点，75 个变异位点，其中 46 个转换位点，29 个颠换位点；发生在密码子第三、第一和第二位点的变异分别为 71%、25%和 6%；种内序列歧异度为 0 ~ 0.5%，而种间为 16% ~ 19%（表 4）。

COⅠ和 COⅡ区的转换/颠换（si/sv）分别是 1.1 和 1.6，显然 COⅠ区比 COⅡ区有更高的颠换率。将 COⅠ、COⅡ的核苷酸序列翻译成氨基酸序列进行比对可看到，同种鳞石蛾的成虫和幼虫几乎是完全相同的。

引入 *Cochliomyia hominivorax*（Diptera：Calliphoridae，GenBank 检索号 AF260826）（Lessinger et al，2000）序列作外群，分别用 COⅠ + COⅡ、COⅠ、COⅡ的核苷酸序列及 COⅠ、COⅡ预测的氨基酸序列以邻接法构建系统发生树（图 1），Bootstrap 1 000 次循环检验结果表明，最高和最低置信度分别为 100 和 47。各种 NJ 树均显示，4 种鳞石蛾的成虫及其疑似幼虫均以极高的置信度彼此聚类在一起。

表 2　本研究测定的 4 种鳞石蛾线粒体 DNA-COⅠ + Ⅱ序列

Table 2　Mitochondrial COⅠ + Ⅱ sequences from 4 species of Lepidostomatidae in this study

序号 Species code	种名 Species	虫态 Dev. stage	序列长度 Seq. length (bp)	检索号 GenBank accession no.
1	*Lepidostoma flavum*	A	2 240	AY396143
2		L	2 239	AY490800
3	*L. fui*	A	1 718	AY396144
4		L	2 240	AY490799
5	*L. arcuatum*	A	2 236	AY536735
6		L	2 210	AY536736
7	*Paraphlegopteryx morsei*	A	2 237	AY536737
8		L	2 237	AY536738

A：雄成虫（Adult male）；L：幼虫（Larvae）。

表 3 4 种鳞石蛾线粒体 DNA-CO Ⅰ 中变异位点数（下三角）及种间、种内核苷酸序列歧异度（上三角）

Table 3 Number of non-conserved nucleotides (below diagonal) and percentage of intra- and inter-specific polymorphisms (above diagonal) in mitochondrial CO Ⅰ of 4 Lepidostomatidae species

序号 Species code*	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0.9%	14%	14%	17%	16%	24%	24%
2	14	0	14%	14%	16%	16%	23%	23%
3	152	151	0	0	14%	14%	19%	19%
4	194	194	0	0	14%	14%	19%	19%
5	224	225	150	201	0	0.2%	21%	21%
6	220	221	149	197	3	0	21%	21%
7	270	270	191	246	277	273	0	0.26%
8	269	269	190	245	277	273	4	0

*序号所代表的标本与表 2 同（Species codes correspond to ones in Table 2）。

表 4 4 种鳞石蛾线粒体 DNA-CO Ⅱ 中变异位点数（下三角）及种间、种内核苷酸序列歧异度（上三角）

Table 4 Number of non-conserved nucleotides (below diagonal) and percentage of intra- and inter-specific polymorphisms (above diagonal) in mitochondrial CO Ⅱ of 4 Lepidostomatidae species

序号 Species code*	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0.33%	16%	16%	17%	17%	19%	19%
2	2	0	16%	16%	16%	16%	19%	18%
3	74	72	0	0	16%	16%	17%	17%
4	85	83	0	0	16%	16%	17%	17%
5	91	89	75	87	0	0	19%	19%
6	91	89	75	87	3	0	19%	19%
7	101	99	75	87	97	97	0	0.5%
8	99	97	75	87	95	95	4	0

*序号所代表的标本与表 2 同（Species codes correspond to ones in Table 2）。

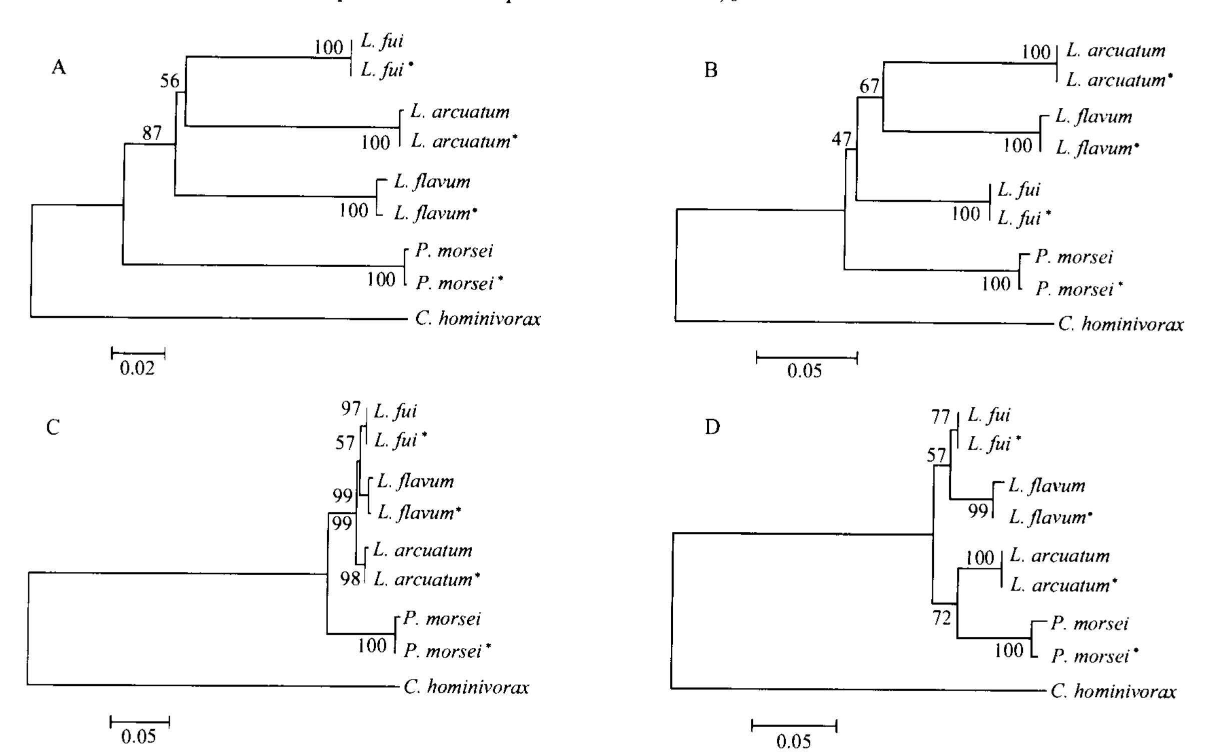


图 1 4 种鳞石蛾线粒体 DNA-CO Ⅰ、CO Ⅱ 核苷酸序列及其氨基酸序列的 NJ 分子系统树

Fig.1 NJ trees of CO Ⅰ、CO Ⅱ nucleotide sequences and their amino acid sequences from 4 species of Lepidostomatidae

A. CO Ⅰ 核苷酸序列（CO Ⅰ nucleotide seq.）；B. CO Ⅱ 核苷酸序列（CO Ⅱ nucleotide seq.）；C. CO Ⅰ 氨基酸序列（CO Ⅰ amino acid seq）；D. CO Ⅱ 氨基酸序列（CO Ⅱ amino acid seq.）。

分支处的数字为置信度，*Cochliomyia hominivorax* 为外群，加“*”者为幼虫（Numbers indicate bootstrap confidence values, using *Cochliomyia hominivorax* as outgroup species. Larva was marked by a asterisk）。

3 讨论

本研究中4种鳞石蛾的种间序列歧异度为14%~24%，同种内成幼虫之间的序列歧异度为0~0.9%。Wells & Sperling（2001）发现在食腐肉蝇中，COⅠ+Ⅱ序列歧异度≤1%的为种内差异，≥3%的为种间差异。本研究支持这一发现。根据上述序列歧异度和多种系统发生树的分支状况可以确认供试幼虫的分类地位。

COⅠ区4种鳞石蛾的种间序列歧异度为14%~24%（表3），变异幅度远大于COⅡ区的16%~19%（表4），且COⅠ区比COⅡ区有更高的颠换率，表明COⅠ区比COⅡ区更适于种属水平的分类。

以COⅠ+COⅡ、COⅠ、COⅡ核苷酸序列和氨基酸序列构建的NJ树（图1）呈现出不同的分支式样。COⅡ核苷酸序列的NJ树（图1B）反映出弓突鳞石蛾与黄褐鳞石蛾有更近的亲缘关系，与根据成虫形态学建立的系统关系相吻合（同属于*Lepidostoma hirtum*分支）（Weave，2002）；COⅠ+COⅡ和COⅠ核苷酸序列的NJ树的分支式样完全相同（图1A），均显示弓突鳞石蛾与傅氏鳞石蛾关系更为亲密（后者属于*Lepidostoma ferox*分支）；而根据COⅠ、COⅡ氨基酸序列构建的NJ树（图1：C，D）却均显示黄褐鳞石蛾与傅氏鳞石蛾关系更为亲密，COⅡ氨基酸序列的NJ树还显示出弓突鳞石蛾与不同属的莫氏斑胸鳞石蛾关系反而更近。Russo et al（1996）曾指出，对于亲缘关系较远的生物（不同的目），COⅠ、COⅡ的核苷酸序列比氨基酸序列更不适合建树；而本研究表明，对于亲缘关系较近的生物（同一科），COⅡ基因的核苷酸序列似乎比其氨基酸序列更适合建树。由于本研究只是致力于成幼虫的联系，有关COⅠ、COⅡ的建树效能还有待积累更多种类的序列信息来深入探讨。而对于水生昆虫种类鉴定及其成幼虫联系研究来说，上述的NJ树都是可用的，但选用较短的序列更为经济。

致谢：感谢南京农业大学分子植物病理学实验室王金生教授、邵敏老师对本研究提供的指导和支持。南京农业大学昆虫系孙长海副教授、学友胡本进和陆爽在研究过程中给予帮助，南京师范大学遗传资源研究所周开亚教授对论文提出宝贵指导意见，在此一并致谢。

参考文献：

Clary DO, Wolstenholme DR. 1985. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code [J]. *J. Mol. Evol.*, **22** (3): 252-271.

Bertocher SH. 1980. An electrophoretis key for distin guishin species of the genus *Rhagoleiis* (Diptera: Tephritidae) as larvae, pupae or adults [J]. *Ann. Entomol. Soc. Am*, **73**: 131-137.

Drew RAI, Hardy DE. 1981. *Dacus* (*Bactrocerg*) opiliae: A new sibling species of the dorsalis complex of fruit flies from Northern Australia (Diptera: Tephritidae) [J]. *J. Aust. Entomol. Soc.*, **20**: 134-139.

Lessinger AC, Junqueira ACM, Lemos TA, Lemos TA, Kemper EL, Silva FR da, Vettore AL, Arruda P, Azeredo-Espin AML. 2000. The mitochondrial genome of the primary screw-worm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) [J]. *Ins. Mol. Biol.*, **9** (5): 521-529.

Malgorn Y, Coquoz R. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae an interest in forensic entomology [J]. *Foren. Sci. Int.*, **102**: 111-119.

Morse J, Yang LF, Tian LX. 1994. Aquatic Insect of China Useful for Monitoring Water Quality [M]. Nanjing: Hohai University Press. 315.

Roehrdanz RL. 1997. Identification of tobacco budworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) during early developmental stages by polymerase chain reaction fragment length polymorphism [J]. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **90** (3): 329-332.

Russo CAM, Takezaki N, Nei M. 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **13**: 525-536.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain primers [J]. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **87** (6): 651-701.

Sperling FAH, Anderson GS, Hickey DA. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation [J]. *J. Foren. Sci.*, **39** (2): 418-427.

Weaver Ⅲ JS. 2002. A synonymy of the caddisfly genus *Lepidostoma rambur* (Trichoptera: Lepidostomatidae), including a species checklist [J]. *Tijdschrift voor Entomol.*, **145** (2): 173-192.

Wells JD, Sperling FAH. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) [J]. *Foren. Sci. Int.*, **120**: 110-115.